

Konsentrasi Hambat minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) Ekstrak Propolis Lawang Terhadap *Fusobacterium nucleatum*

(Minimum Inhibitory Concetration and Minimum Bactericidal Concentration Propolis Extract from Lawang Against *Fusobacterium nucleatum*)

Anindita Mayang Sari¹, Ira Widjiastuti², Setyabudi²

¹Mahasiswa Strata -1 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

²Staf Pengajar Departemen Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

ABSTRACT

Background. Patient commonly comes to dental clinic complained and diagnosed as caries dentin which is not perforated. In this case bacteria that plays important role to induced pain is *Fusobacterium nucleatum*. Therefore it is necessary to discover another antimicrobial agent deriving from nature which doesn't have any or less harmful effect to the body. Propolis considered as best nature materials due to Its active components, flavonoid and trepenoids, that is known as antimicrobial agent with their various mechanism of action. **Purpose.** The aim of this study is to find out the antimicrobial effect of propolis against *Fusobacterium nucleatum*, by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). **Method.** This research is an observational study. Propolis extract produced by propolis farm on lawang. The antibacterial activity test was performed by direct contact and continued by colony count to determine the value of MIC and MBC of extract propolis against *Fusobacterium nucleatum*. **Result.** Based on the colony counting showed that the propolis extract's MIC is 1,48% and MBC is 1,54% beside that the number of colony decreasing as the concentration of propolis extract increased. **Conclusion.** MIC value of propolis extract against *Fusobacterium nucleatum* is 1,48% and MBC value of propolis extract is 1,54%.

Keywords : Propolis extract, antimicrobial, Flavonoid, *Fusobacterium nucleatum*

Korespondensi (*correspondence*): Anindita Mayang Sari, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl Prof. Dr Moestopo no 47, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia 60132 telp 031 -5030255 E-mail: aninditamysr@gmail.com.

PENDAHULUAN

Berdasarkan data Riskesdas 2007, 75% penduduk Indonesia memiliki riwayat karies gigi dengan tingkat keparahan gigi (indeks DMF-T) sebesar 5 gigi setiap orang.⁵ Umumnya pasien mengatakan adanya rasa nyeri dan hipersensitifitas pulpa ketika kedalaman karies sudah mencapai karies profunda. Penyebab timbulnya hipersensitifitas gigi terhadap suhu

pada karies profunda adalah *Fusobacterium nucleatum*.⁹ Pada karies profunda ditemukan persentase *Fusobacterium nucleatum* sebesar 5,74%, dan ada di peringkat kedua terbanyak setelah *Prevotella spp*.¹⁶

Saat ini sedang dikembangkan pemanfaatan bahan alam yang digunakan sebagai obat karena jarang menimbulkan efek samping. Salah satu produk alami telah digunakan selama beberapa tahun sebagai bahan obat rakyat adalah *apitherapy*, atau terapi

dengan produk lebah (misalnya madu, serbuk sari, propolis, madu yang diperkaya, ramuan madu), adalah sebuah tradisi lama yang telah direvitalisasi pada penelitian terbaru.³ Hasil penelitian Kosalec (2005) membuktikan bahwa propolis memiliki efek antioksidan, antibakteri, antijamur, antivirus, antiinflamasi, anti-tumor dan imunomodulasi.¹² Berdasarkan analisis menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)*, propolis yang dihimpun oleh lebah berasal dari tumbuhan poplar menunjukkan bahwa propolis mengandung berbagai macam senyawa. Kandungan senyawa tersebut adalah : asam amino, asam alifatik dan esternya, asam aromatik dan esternya, alkohol, aldehida, khalkon, dihidrokhalkon, flavanon, flavon, hidrokarbon, keton, dan terpenoid, yang merupakan konstituen bioaktif propolis merah dari Brazil. Senyawa tersebut berperan dalam aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.² Berdasarkan penelitian terdahulu propolis terbukti efektif terhadap bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif.⁸ Komposisi propolis sangat dipengaruhi oleh jenis dan umur tumbuhan, iklim, dan waktu.²⁰ Koru (2007), telah meneliti daya hambat minimum dan daya bunuh minimum bakteri *Fusobacterium nucleatum* dari berbagai macam daerah penghasil ekstrak propolis. Propolis dari Iran memiliki KHM 0,0128% dan KBM 0,0256 % , sedangkan propolis yang berasal dari Brazil memiliki KHM 0,0512 % dan KBM 0,0512% .¹¹ Indonesia juga merupakan penghasil propolis, namun propolis yang ada di Indonesia sebagian besar di hasilkan oleh lebah *Apis mellifera*.¹⁸ Tujuan dari penelitian ini adalah Untuk mengetahui konsentrasi hambat minimal dan konsentrasi bunuh minimal ekstrak propolis Lawang terhadap *Fusobacterium nucleatum*.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian adalah *eksperimental laboratories* dengan rancangan penelitian *The Post Test Only Control Group Design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Unair Surabaya. Ekstraksi propolis dilakukan dengan metode maserasi dengan ethanol 70%.

Kandungan propolis dalam ekstrak sebesar 11,45%. Kemudian diencerkan menjadi beberapa konsentrasi yaitu 1,78%, 1,72%, 1,65%, 1,6%, 1,54%, 1,48%, 1,43%.

Ekstrak propolis berbagai konsentrasi.ditaruh sebanyak 0,5 ml ditaruh di media BHI cair yang Masing masing ditambahkan 0,1 ml *Fusobacterium nucleatum*, Setiap tabung diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Dilakukan subkultur pada media Muller-Hinton agar. Inkubasi dalam anaerobic jar pada 37 °C selama 24 jam, Penrhitungan koloni *Fusobacterium nucleatum* dengan menggunakan *Quebec Colony Counter*.

Analisa statistik menggunakan tes *Kolmogorov-Smirnov* untuk uji normalitas data dan uji perbedaan pada tiap kelompok data penelitian dengan tes *Independent T Test*.

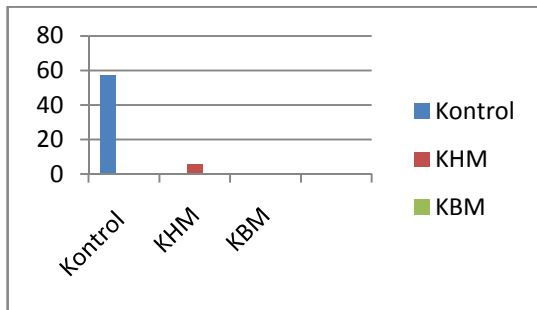
HASIL

Dari penelitian pendahuluan diperoleh hasil diantara konsentrasi 1,43% dan 2,86% adalah KHM dan KBM karena perkiraan bakteri yang hidup 0,1% dan 10% berada diantara kedua presentasi tersebut. Untuk mengetahui konsentrasi hambat minimal dan konsentrasi bunuh minimal maka dilakukan pengamatan dan penghitungan bakteri pada 1,78%, 1,72%, 1,65%, 1,6%, 1,54%, 1,48%, 1,43%. Dari data ini kemudian didapatkan hasil :

Tabel 1 Rerata dan simpang baku KHM dsan KBM ekstrak propolis Lawang terhadap *Fusobacterium nucleatum* (CFU/ml)

Perlakuan	n	Rerata	SB
KHM Ekstrak propolis 1,48%	7	11.429	2.070
KBM Ekstrak propolis 1,54%	7		
Kontrol Positif	7	57.143	4.879

Keterangan: n = jumlah sampel
SB = Simpang Baku



Gambar 1. Persentase rerata KHM dan KBM ekstrak propolis Lawang terhadap *Fusobacterium nucleatum*

Bedasarkan hasil penelitian pada gambar 1 dapat dilihat bahwa pada konsentrasi 1,48% didapatkan jumlah koloni yang hidup sekitar 9,8%, sehingga konsentrasi ini menjadi Konsentrasi Hambat minimal karena pada konsentrasi ini 90% pertumbuhan bakteri dihambat selama 24 jam.²² Pada konsentrasi 1,54% sudah tidak ditemukan lagi pertumbuhan bakteri, sehingga konsentrasi ini disebut Konsentrasi Bunuh minimal. KBM adalah konsentrasi terendah dari ekstrak propolis yang mampu membunuh bakteri sebanyak 99,9%.²²

Sebelum data dilakukan analisis statistik Uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov*, hasilnya salah satu kelompok penelitian tidak dapat diperhitungkan distribusinya, namun kelompok data penelitian yang lain hasilnya menunjukkan $p > 0,05$ yang artinya data dapat berdistribusi normal, karena kelompok data penelitian yang tidak dapat diperhitungkan adalah kelompok penelitian konsentrasi bunuh minimal yang dimana sudah tidak ada pertumbuhan koloni bakteri. Untuk melihat signifikansi perbedaan antar kelompok maka menggunakan *independent t-Test*, hasil *t-Test* $p < 0,05$ yang berarti memiliki perbedaan signifikan.

Tabel 2. Hasil perhitungan *Independent t-Test*

Kelompok perlakuan	I	II	III
I		.000	.000
II	.000		.000
III	.000	.000	

Keterangan :

I : Dengan penambahan ekstrak propolis Lawang 1,43 %

II : Dengan penambahan ekstrak propolis Lawang 1,48%

III : Dengan penambahan ekstrak propolis Lawang 1,54 %

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimikroba yang dimiliki oleh ekstrak propolis Lawang terhadap bakteri *Fusobacterium nucleatum*. Aktivitas antimikroba obat biasanya dinilai dengan penentuan konsentrasi hambat minimal (KHM) atau bakteriostatik dan Konsentrasi bunuh minimal (KBM) atau bakterisid dari obat secara *in vitro* setelah inkubasi anaerob.¹⁴ Untuk penentuan KHM dan KBM digunakan metode hitung koloni, karena berdasarkan penelitian terdahulu warna ekstrak yang pekat dan gelap susah untuk menentukan melalui metode dilusi.

Pembuatan ekstrak propolis ini dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Krell (2006) menyatakan bahwa ekstrak alkohol 70% memberikan hasil yang terbaik dalam beberapa penelitian karena memiliki efek untuk meningkatkan kinerja antimikroba dari bahan aktif propolis.²⁰ Ekstrak propolis yang terkandung dalam larutan ekstrak propolis adalah 11,45%.

Fusobacterium nucleatum adalah salah satu bakteri yang ditemukan dalam karies jenis profunda dan memiliki peran penting dalam menimbulkan rasa nyeri.⁹ dalam aplikasinya propolis dapat menjadi salah satu bahan herbal sebagai bahan pulp capping yang efektif meneruskan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Sabir (2005), hasil penelitian secara *in vivo* membuktikan bahwa ekstrak propolis memiliki efek memperlambat inflamasi pulpa dan menstimulasi pembentukan dentin reparatif dan kolagen.⁷

Sifat antibakteri yang dimiliki oleh propolis disebabkan oleh adanya komponen aktif utamanya yaitu flavonoid. aktivitas antibakteri propolis adalah bakteriostatik dan dapat bakterisida dalam konsentrasi tinggi.⁶ sebagai antibakteri, antijamur, dan antivirus, propolis menyajikan banyak aktivitas biologis lainnya bermanfaat seperti antioksidan, antiperadangan, antitumor, hepatoprotektif, anestesi lokal, imunostimulan dan antimutagenik.¹⁰ Berdasarkan hasil penelitian Cushnie *et al* beberapa senyawa aktif yang terkandung didalam flavonoid..yaitu

galangin, quercetin dan epigallocatechin dapat menyebabkan terjadinya perubahan permeabilitas membran sel, menghambat metabolisme energy dan menghambat sintesis asam nukleat. Senyawa aktif lainnya yaitu robinetin dan myricetin bersama dengan epigallocatechin menghambat sintesis DNA dan RNA).⁴ Takaisi *et al.*, (1994) menyatakan bahwa propolis dapat mempunyai efek antimikroba dengan cara mencegah pembelahan sel sehingga menghasilkan bahan yang disebut sebagai Pseudo Multicellular Streptococcus. Propolis dapat merusak membran Sitoplasma dan dinding sel yang menyebabkan bacteriolisis parsial dan menghambat sintesa protein. Sudah terbukti bahwa mekanisme kerja propolis terhadap sel bakteri sangatlah kompleks.²¹

Propolis dan beberapa komponen sinamat dan flavonoid yang ditemukan memisahkan energi transducing membran sitoplasma dan menghambat motilitas bakteri, yang dapat berkontribusi untuk taktivitas antimikroba.¹⁷

Percobaan ini dilakukan dengan penentuan konsentrasi metode penipisan percobaan pendahulu (*trial*), kemudian diteruskan dengan metode pengenceran pada konsentrasi 1,78%, 1,72%, 1,65%, 1,6%, 1,54%, 1,48%, 1,43%. Pada konsentrasi 1,48% didapatkan jumlah koloni yang hidup adalah 5 yaitu sekitar 10%, sehingga konsentrasi ini menjadi Konsentrasi Hambat minimal karena pada konsentrasi ini 90% pertumbuhan bakteri dihambat selama 24 jam.²² Pada konsentrasi 1,54% sudah tidak ditemukan lagi pertumbuhan bakteri, sehingga konsentrasi ini disebut Konsentrasi Bunuh minimal. KBM adalah konsentrasi terendah dari ekstrak propolis yang mampu membunuh bakteri sebanyak 99,9%.²²

Berdasarkan penelitian sebelumnya telah di peroleh hasil konsentrasi hambat minimal propolis Iran terhadap *Fusobacterium nucleatum* yang memiliki KHM 0,0128% dan KBM 0,0256%, sedangkan propolis yang berasal dari Brazil memiliki KHM 0,0512% dan KBM 0,0512%.¹¹ Penelitian Marghitas *et al.*, (2010) KHM pada bakteri *Staphylococcus aureus* adalah 0.019% *Escherichia coli* adalah 0,625%.¹⁷ Berikut adalah tabel hasil penelitian sebelumnya dan variable perbedaan yang kemungkinan besar mempengaruhi rentang angka KHM dan KBM.

Nama propolis	Variabel				KHM	KBM
	Kons. propolis	Jenis lebah	Daerah peternakan lebah	Nama bakteri		
Irano – Turanian	9,4%	-	Ankara-Kazan	<i>F. nucleatum</i>	0,0128	0,0256
Mediterranean	4.6%	-	Brazil	<i>F. nucleatum</i>	0,0512	0,0512
Romanian propolis	5%	<i>Apis mellifera</i>	Transylvania	<i>S. aureus</i> (gram +)	0.019	
Romanian propolis	5%	<i>Apis mellifera</i>	Transylvania	<i>E. coli</i> (gram +)	0.625	
Indonesian propolis	11,45%	<i>Apis mellifera</i>	Lawang	<i>F. nucleatum</i>	1,48	1,54

Perbedaan rentang angka dengan penelitian yang sebelumnya disebabkan oleh adanya perbedaan komposisi atau senyawa aktif yang terkandung dalam propolis. Beberapa faktor yang mempengaruhi komposisi propolis yaitu spesies lebah, jenis dan umur tumbuhan, iklim, dan waktu di mana propolis tersebut diperoleh.²⁰ Sifat antimikroba yang dimiliki ekstrak juga dipengaruhi oleh lama penyimpanan dari ekstrak. Penyimpanan lebih dari 12 bulan akan menghilangkan kemampuan antibakteri sehingga propolis tidak dapat digunakan lagi.¹³ Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini berupa ekstrak hasil ekstraksi yang mengandung seluruh jenis senyawa flavonoid yang terdapat pada propolis *apis mellifera*. Propolis *apis mellifera* dikumpulkan dari sarang lebah yang terdapat di Kabupaten lawang propinsi Jawa timur. Terletak di daerah dataran tinggi dengan tanaman yang didominasi oleh pohon randu

Propolis ini mengandung bahan aktif flavonoid 5,12% popolifenol 0,16% caffeic acid 8,61% dan minyak atsiri 0,81%. Propolis memiliki aktivitas antimikroba yang signifikan terhadap bakteri Gram-positif dan ragi.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Marghitas *et al* (2010) menunjukkan aktivitas

antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, dengan KHM 0.019% menunjukkan perbedaan yang jauh dari hasil percobaan ini. Pada penelitian terdahulu telah menunjukkan bahwa aktivitas antimikroba propolis terbatas terhadap bakteri Gram-negatif dibandingkan terhadap bakteri Gram-positif/¹ Perbedaan aktivitas antimikroba ini disebabkan karena adanya perbedaan struktur pada bakteri gram negative dan bakteri gram positif. Pada bakteri gram negative dinding selnya memiliki *lipopolisakarida* yang membuat bakteri bersifat lebih pathogen dan bersifat endotoksin yang sangat toksik.¹⁹

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa:

Konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak propolis Lawang terhadap *Fusobacterium nucleatum* adalah 1,48% dan konsentrasi bunuh minimal (KBM) ekstrak propolis Lawang terhadap *Fusobacterium nucleatum* adalah 1,54%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur pada Allah SWT atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga skripsi yang berjudul Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) Ekstrak Propolis Terhadap *Fusobacterium Nucleatum* dapat terselesaikan. Pada kesempatan kali ini, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar - besarnya kepada :

1. Prof. RM Coen Pramono D, drg., SU., SpBM (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan untuk menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
2. M. Rulianto, drg., M.S., Sp.KG(K) selaku Kepala Departemen Konservasi Gigi yang telah memberikan izin untuk pembuatan skripsi
3. Dr. Ira Widjiastuti, drg., MKes., Sp.KG (K) selaku Pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, dan meluangkan waktu selama pembuatan skripsi
4. Setyabudi, drg., MARS., Sp.KG selaku Pembimbing serta yang telah memberikan

bimbingan dan masukan untuk pembuatan skripsi

5. Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg., M.Sc., Sp.KG (K), sebagai dosen wali saya atas saran dan bimbingannya selama ini.
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang terkait dalam pembuatan jurnal

DAFTAR PUSTAKA

1. Ahuja, Vipinann.. Aphitherapy – A Sweet Approach to Dental Diseases. Journal of Academy of Advanced Dental Research, 2011. 2:2.
2. Bankova V. *Recent trends and important developments in propolis research*. Evid Based Complement Alternat Med, 2005. 2:29-32.
3. Banskota, A.H, Mayer,P.A. *Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis*. Phytomedicine. 2001.16-23.
4. Cushnie,T.P Tim & Andrew J . Lamb. *Review Antimicrobial Activity of flavonoids*. Int Jou of Antimechl Ag. 2005. 26:343.
5. Depkes. *Tidak Sehat jika Tidak Memiliki Gigi dan Mulut yang Sehat*. Tersedia di <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1642-tidak-sehat-jika-tidak-memiliki-gigi-mulut-sehat.html> 2011. diakses tanggal 15 Maret 2012.
6. Drago, L.; Mombelli, B.; De Vecchi, E; Fassina, M. C.; Gismondo, M. R. *In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract*. Journal of Chemotherapy, 2000. 390-5
7. Sabir, A. *Respons Inflamasi pada Pulpa Gigi Tikus Setelah Aplikasi Ekstrak Ethanol Propolis*. Majalah Kedokteran Gigi. 2005. Dent J 38:7
8. Fokt. *How does Propolis Prevent Hive Protection? The Antimicrobial Properties of Propolis*. Current research, technology and education topics in App Microbiology and Microbial Biotech. 2010. p: 481.
9. Hahn CL, Falkler WA Jr. *Correlation between thermal sensitivity and*

- microorganisms isolated from deep caries*. J Encoded; 2007. 19:26 –30.
10. Kim, D. M. ;Lee, G. D. ; Aum, S. H. ;Kim, H. J. *Preparation of propolis nanofood and application to human cancer*. In Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2008, h. 1704-1710.
 11. Koru ,O, Toksoy,F,, Acikel ,C. *In vitro Antimicrobial Activity of Propolis Samples from Different Geographical Origins against certain Oral Pathogens* . Anaerobe. .200713: 140-145.
 12. Kosalec,I, Stjepan, P, Marina, B, Sanda, V. *Flavonoid analysis and antimicrobial activity ofcommercially available propolis products*. , Acta Pharm. 2005. 55:423–430.
 13. Krell, R. *Value-Added Products From Beekeeping*; FAO Agricultural Services Bulltein No.124. FAO of the United Nations Rome. 2006.
 14. Levison, Matthew E. *Pharmacodynamics of antimicrobial Drugs*. Infectious Disease Clinics of North America 18 ed..Philadelphia,, USA. 2004. P 451-465.
 15. Marghitas, L.A, Mihai, M.C, Chirilla, F,Dezmirean ,D.F, Fit, N. *The Study of the Antimicrobial Activity of Transylvanian (Romanian) Propolis*. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj . 2010. 40-44.
 16. Maripandi, A, Salamah, A.A, Kumar, A. *Prevalence of Dental Caries Bacteria Pathogens and Evaluation of Inhibitory Effect on Different Tooth Pastes Against Streptococcus spp*. Afr. J. Microbiol. 2011. 5:14:1778-83.
 17. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC *Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria*. Microbiol Res, .1997. 152:239-246.
 18. Murtidjo, A. *Memelihara Lebah Madu*. Kanisius. Yogyakarta. 1991.h: 90-100.
 19. Samanarayake, L.P. *Essential Microbiology for Dentistry* .2nd ed. London. Churcill livingstone. 2002. p: 53-60.
 20. Suranto, A. *Dahsyatnya Propolis Untuk Menggempur Penyakit*. Jakarta: AgroMedia. 2010.h: 90-100.
 21. Takaisi-Kikuni NB, Schilder H : *Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance*. Planta Me.1997 60:222-7.
 22. Torres, A, Menendez, Rosario. *Community-Acquired Pneumonia: Strategies for Management*. John wiley & sons Ltd. Southern Gate,England 2008. p:155-6.

